

エンドトキシンのラット肝ミトコンドリアに 及ぼす影響についての研究

II. エンドトキシン投与時のラット肝ミトコンドリア機能障害 におけるフィブリン血栓の役割について

鍋田 光一 小西 裕蔵

札幌医科大学外科学第1講座 (指導 早坂 晃教授)

Effects of *E. coli* Endotoxin on Rat Liver Mitochondria

II. Role of Fibrin Thrombi in Rat Liver Mitochondrial Dysfunction Induced by Endotoxin

Koichi NABETA and Yuzo KONISHI

Department of Surgery (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. H. Hayasaka)

Survival rate, hematologic changes, pathologic changes of liver, and liver mitochondrial function were investigated in heparinized and non-heparinized rats to study a role of disseminated intravascular coagulation (DIC) in the pathogenesis of hepatic mitochondrial dysfunction induced by endotoxin.

The following results were obtained.

1) Pretreatment of rats with heparin (1,000 U.) markedly alleviated lethality to shock induced by i. v. injection of *E. coli* endotoxin (Et).

2) At 3 hours after Et administration in non-heparinized rats, a decrease of platelet count and fibrinogen concentration and an increase of fibrin/fibrinogen degradation products (FDP) were observed, and bleeding and zonal necrosis were seen in the periportal area of hepatic lobules in which the formation of fibrin thrombi was remarkable. Hepatocytes and Kupffer cells in the periportal area showed considerable degeneration. Mitochondria in these hepatocytes were swollen. Respiratory control ratio and adenosine diphosphate/oxygen ratio (ADP/O) of liver mitochondria decreased at the same time.

3) At 3 hours after Et administration in pre-heparinized rats, a decrease of platelet count and fibrinogen concentration, together with bleeding in the periportal area were not seen, and the formation of fibrin thrombi was markedly prevented. The structure of hepatocytes, Kupffer cells and their intracellular organelles, and the function of mitochondria remained relatively intact.

From these results, it may be considered that damming of blood in the portal system by thrombi in liver plays an important role in the pathogenesis of liver mitochondrial dysfunction caused by endotoxin.

(Received October 30, 1980 and accepted January 19, 1981)

1 結 言

近年、外科的感染症は各種の抗生物質の発達や免疫促進剤ないし刺激剤、副腎皮質ホルモン、高カロリー輸液などによる治療の普及などにより、その様相は一変した。しかし、消化管穿孔や縫合不全などによる汎発性腹膜炎、急性胆嚢胆道炎、敗血症など外科領域で遭遇する重症感染症は、術前・術後管理や麻酔学の進歩により、poor risk 患者に対しても積極的に侵襲度の大きな手術や検査が行なわ

れるようになったことと相俟って、その頻度は少なくなると、重篤な状態に到ることも稀ではない¹⁾。これら重症感染症に伴う敗血症性ショックは一般に重篤で、ショックの経過中あるいは離脱後に発生する重要臓器障害はしばしば患者の転帰を左右する原因となる。このような臓器として、これまで肺、腎、心、胃腸などが注目され、幅広い研究がなされているが²⁻⁴⁾、ショックによる循環不全は当然肝臓においても同様の障害がおこるものと思われる。しかし、肝は非常に予備力が強く、また他臓器障害の症状に

mask されやすいため、肝障害は表面に現われにくいということが考えられる。

古くから肝臓はエンドトキシンの target organ の一つとされ、radioisotope による研究において標識エンドトキシンが肝臓に高頻度に出されている^{5,6)}。最近では sub-cellular level での研究が多くなってきており、小野江⁷⁾は肝の電顕的観察により、ショック時には早期から特徴的なミトコンドリアの形態的变化が発生することを報告している。著者らは先の論文⁸⁾でエンドトキシンショック時のエネルギー産生能について検討し、エンドトキシン投与後に肝ミトコンドリア機能障害が発生することを報告した。

一方、実験的細菌性ショックやエンドトキシンショックにおいて、血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) と考えられる血液凝固線溶異常が発生することはよく知られており⁹⁻¹²⁾、臨床的にもグラム陰性菌血症の経過中ショックに陥った症例で DIC の発生がしばしば見られることが報告されている¹³⁻¹⁷⁾。このような事実は細菌性ショックやエンドトキシンショックにおける重篤な臓器障害が DIC と何らかの関係をもつことを示唆している。もし、この DIC にみられる全身臓器の微小血栓が全身循環不全や肝循環障害に重要な役割りを果たしているとすると、エンドトキシンショックにおいても肝に重大な障害がおこることが考えられ、ことに通常変性初期から敏感に反応すると考えられているミトコンドリアにも重大な影響を及ぼすことが推察される。著者らはエンドトキシン投与時における肝ミトコンドリア機能障害の原因の検索に興味をもち、本研究ではまず、エンドトキシンと DIC 発生の関連性について、ついでこの DIC が肝ミトコンドリア機能にどのような影響を与えるかについて heparin を用い検討した。

2 実験方法

実験動物：Wistar-King 系ラット (♂, 180 g 前後) を使用し、実験前日より絶食とした。

エンドトキシン：大腸菌エンドトキシン (lipopolysaccharide E. coli 026: B₆ Difco Lab. 以下 Et と略す) を生理食塩液で溶解し使用した。

2.1 予備実験

Et 投与直前に heparin 500 U 投与した群、1,000 U 投与した群、Et 投与後1時間目に heparin 1,000 U 投与した群および2時間目に heparin 1,000 U 投与した群それぞれ 10 匹ずつについて 24 時間の生存率を比較検討した。

2.2 本実験

2.2.1 Et および heparin の投与方法

Heparin 処置群は予備実験の結果より、Et 投与直前に

heparin Na (清水製薬) 1,000 U をラット尾静脈より投与した。一方、heparin 非処置群は Et 投与直前に heparin と同量の生食液を投与した。エーテル麻酔下に致死量の Et (5 mg/100 g 体重) を尾静脈より投与し、以下の測定を行なった。

2.2.2 血液凝固線溶検査

2.2.2.1 血小板数：Et 投与前、投与後 5, 30 分、1, 2, 3, 4 時間目に尾静脈より 20 μ l 採血し、cell kit P 液 (TOA) にて稀釈後血小板自動測定器 (TOA, PL-100) により 100 のディスクリミネーションで測定した。なお、同時に Rees-Ecker 法¹⁸⁾により確認を行なった。

2.2.2.2 血漿フィブリノーゲン濃度：Et 投与前、投与後 1, 2, 3 時間目にエーテル麻酔下に開腹し、下大静脈より採血し、血液と抗凝固剤 (0.1 M クエン酸 Na) を 9 対 1 の量比で混和後、3,000 回転で 10 分間遠沈した。血漿分離後、フィブリノーゲン測定用 Kit (ミドリ十字) を用い、用手法にて測定した。

2.2.2.3 血清 FDP (fibrin/fibrinogen degradation products) 値：フィブリノーゲン測定と同様に採血し、血清分離後ラテックス凝集法にもとづく FDPL-テスト (帝国臓器) を用い測定した。

2.2.3 病理形態学的検索

Et 投与後 1, 2, 3 時間毎に屠殺脱血後、肝臓を剔出し、光顕用には 10% buffered formalin にて固定後パラフィン切片を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE), Periodic Acid Schiff (PAS), Phosphotungstic Acid Hematoxylin (PTAH) 染色を行なった。電顕用には 2% オスミウム酸 (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4) で 2 時間固定し、アルコール脱水し、Epon 812 包埋を行なった。LKB 1 型ミクロトームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニール飽和水溶液とクエン酸鉛溶液で二重染色後 JEM 100 B 型電子顕微鏡で観察した。

2.2.4 肝ミトコンドリア機能測定

Et 投与後 1, 2, 3, 4, 5 時間目に屠殺脱血後、小田の方法¹⁹⁾に準じ、肝ミトコンドリア分画を調整し、萩原の方法²⁰⁾に準じ 0.25 M sucrose, 0.01 M KH₂PO₄, 0.2 mM EDTA, 0.01 M KCl, 0.002 M MgCl₂, 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) の反応液中で 25°C, succinate 基質を用い酸素電極装置 (ユニオン技研) にて、呼吸調節率 (respiratory control ratio, RCR), ADP/O 比, ミトコンドリア mg 蛋白当りの 1 分間の ATP 産生能を測定した。なお、ADP はペーリンガー社製品を用い、蛋白量は Lowry 法²¹⁾にて測定した。

3 実験成績

3.1 実験予備

Heparin 非処置群のラットはすべて6時間以内に死亡した。heparin 処置群の24時間生存率をみると、heparin

500 U 前投与群は20%, 1,000 U 前投与群は60%, Et 投与後1時間目に heparin 1,000 U 投与した群は40%, 2時間目に投与した群は20%であった (Table 1)。以上の結果より本実験は heparin 1,000 U 前投与群を使用した。

Table 1 Survival rate after endotoxin injection

	No. rats	Mortality (12 hrs)	Survival at 24 hrs
Non-heparinized group	10	10 (100%)	0
Pre-heparinized group (1 min. before endotoxin)			
Heparin 500 U	10	6 (60%)	2 (20%)
Heparin 1,000 U	10	4 (40%)	6 (60%)
Post-heparinized group (Heparin 1,000 U)			
1 hr. after endotoxin	10	6 (60%)	4 (40%)
2 hrs. after endotoxin	10	6 (60%)	2 (20%)

3.2 本実験

3.2.1 血液凝固線溶検査

3.2.1.1 血小板数: Et 投与前のラット血小板数は $66.60 \pm 3.38 (\times 10^4/\text{mm}^3)$ であった。両群とも Et 投与5分後には急激な減少がみられ、30分~1時間以内に急速に回復する。Heparin 非処置群ではその後再び減少しはじめ、3時間目では約1/3に減少した。一方、heparin 前処置群では3時間目でも $46.00 \pm 7.95 (\times 10^4/\text{mm}^3)$ とやや減少傾向を示す程度であった (Fig. 1)。

3.2.1.2 血漿フィブリノーゲン濃度: Et 投与前の血

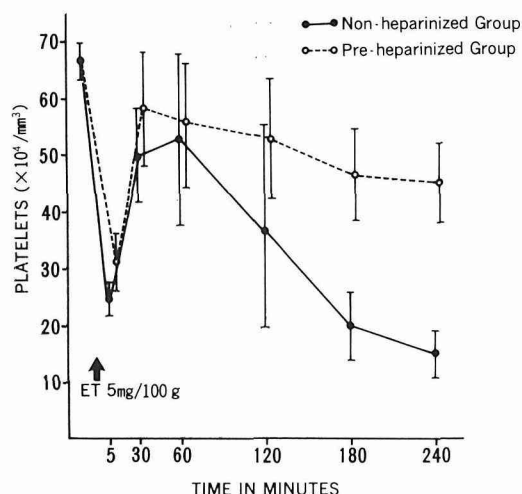


Fig. 1 Changes of platelet count after injection of endotoxin (5 mg/100 g) in rats.

漿フィブリノーゲン値は $243.6 \pm 45.0 \text{ mg/dl}$ であった。Heparin 非処置群では Et 投与2時間目迄は有意の変化を認めなかったが、3時間目になると $60.1 \pm 22.3 \text{ mg/dl}$ と著しい減少が見られた。一方、heparin 前処置群は Et 投与直後より2時間までは heparin 非処置群に比し低値を示す

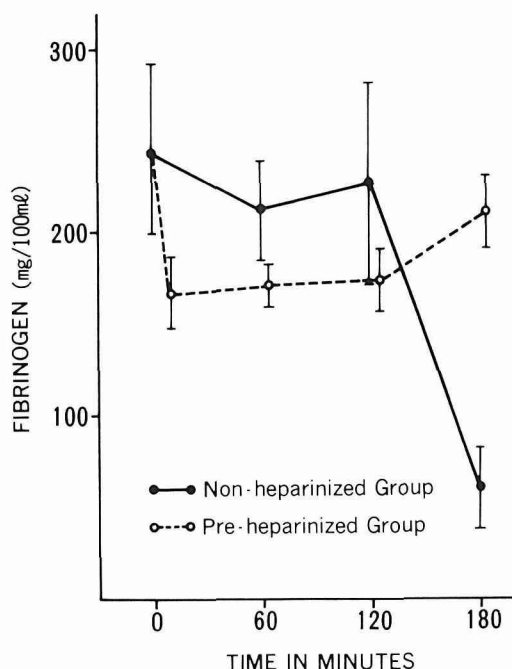


Fig. 2 Changes of fibrinogen concentration after injection of endotoxin in rats.

Table 2 *The content of serum-FDP after injection of endotoxin in rats*

Time (min)	(-)	5× (2.5 µg/ml)	10× (5 µg/ml)	20× (10 µg/ml)	40× (20 µg/ml)	80× (40 µg/ml)
0 (n=5)	5	0	0	0	0	0
5 (n=5)	5	0	0	0	0	0
30 (n=5)	5	0	0	0	0	0
60 (n=5)	5	0	0	0	0	0
120 (n=5)	2	1	1	1	0	0
180 (n=7)	0	0	3	2	1	1

が、次第に増加し、3時間目では 209.8 ± 20.8 mg/dl とほぼ正常値に回復した (Fig. 2).

3・2・1・3 血清 FDP 値: Heparin 非処置群では Table 2 のごとく、Et 投与1時間目迄は陰性であったが、2時間目を過ぎるとやや増加しはじめる。さらに3時間目になると著しい増加が見られた。一方、heparin 前処置群は heparin 使用のため、FDPL-テストでは測定不能であった。

3・2・2 肝の病理形態学的所見

3・2・2・1 光顕的所見: Heparin 非処置群についてみると、Et 投与30分例では門脈の軽度のうっ血以外あまり目立った変化を認めない。1時間例ではグリソン鞘内の門脈に軽度のうっ血とこの周辺の肝細胞内に好酸性で PAS および PTAH 染色陽性の round glassy substances が見

られるようになった。2時間例ではグリソン鞘内の門脈のうっ血は増強し、白血球浸潤が見られるようになったが、肝細胞変化は比較的軽度であった。3時間例ではグリソン鞘内門脈のうっ血は一層増強し、一部血管壁の破綻を伴い、グリソン鞘を中心に著しい出血、壊死が出現する。この出血、壊死は小葉周辺帯から一部中間帯にも及んでいる (Fig. 3)。また中心静脈の多くは拡張し、強い好中球の浸潤と round glassy substances の増加が見られる (Fig. 4)。この頃よりフィブリン血栓が類洞や門脈にしばしば見られるようになり、多くの場合その周辺では肝細胞の著明な変性壊死が相伴って認められた (Fig. 5, 6)。

一方、heparin 前処置群では非処置群の3時間例に見られたようなグリソン鞘内門脈の著明なうっ血や出血、肝細

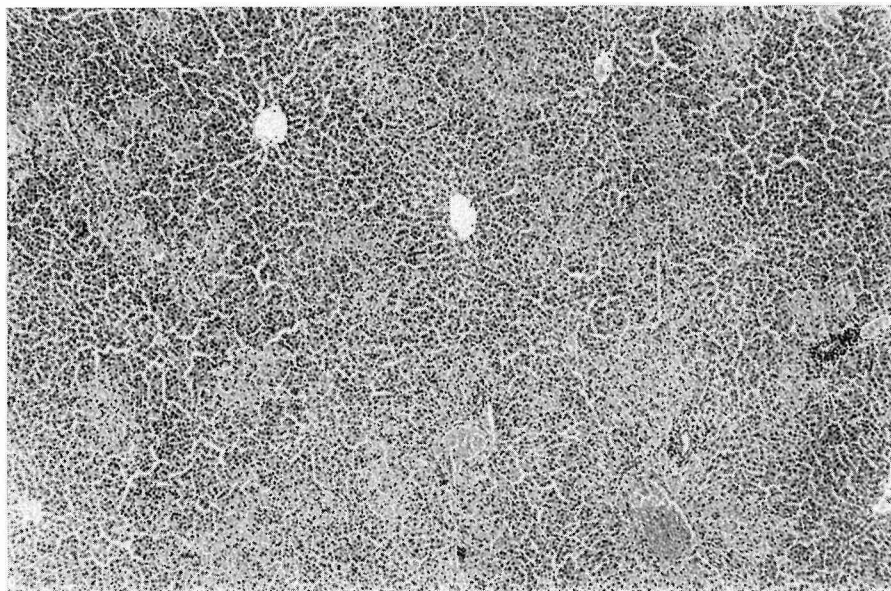


Fig. 3 Light micrograph of rat liver in the non-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin, showing remarkable bleeding and zonal necrosis in periportal area of hepatic lobules. HE stain. (44×)

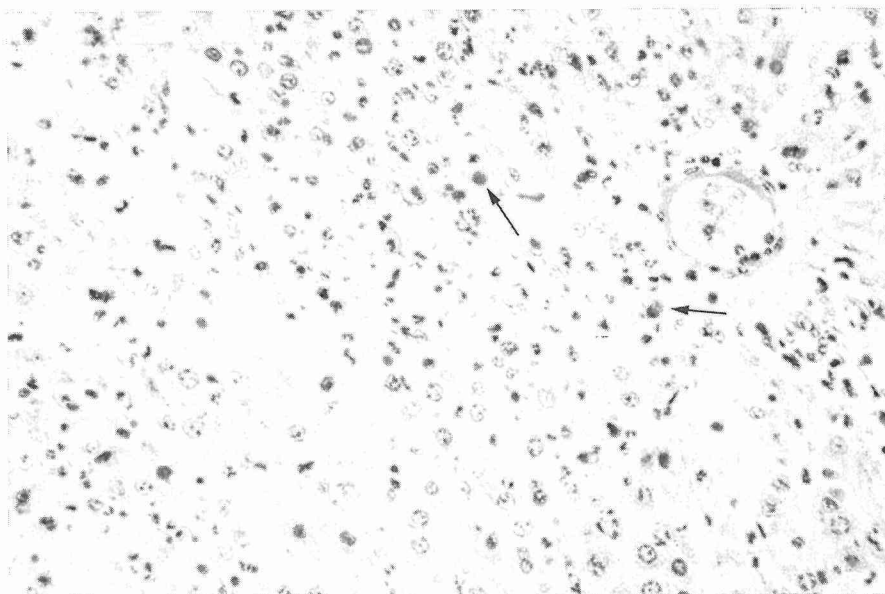


Fig. 4 Light micrograph of rat liver in the non-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin, showing round glassy substances in hepatocytes (arrow). PAS stain. (272×)

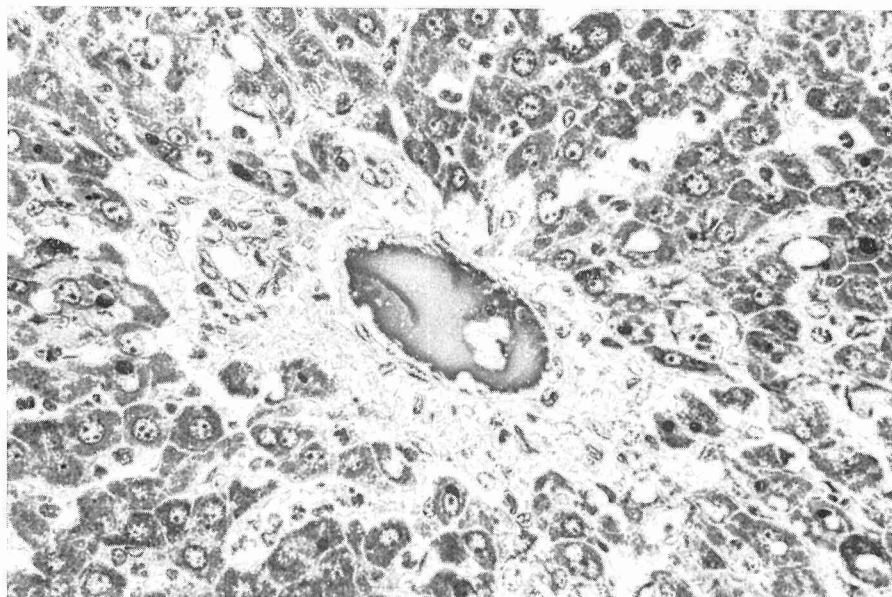


Fig. 5 Light micrograph of rat liver in the non-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin, showing fibrin thrombi in small portal vein. PTAH stain. (435×)

胞の変性壊死は全く認められず (Fig. 7), またフィブリン血栓も認められなかった。PAS, PTAH 陽性の round glassy substances や白血球浸潤は heparin 前処置群でも認められたがその数は少なかった。

3・2・2・2 電顕的所見: Et 投与後の肝電顕所見については平間・小川の報告²²⁾があるのでここでは光顕的に最も変化の強く現われた3時間例の所見について要点のみ述べる。Heparin 非処置群の肝細胞についてみると核質の凝



Fig. 6 Light micrograph of rat liver in the non-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin, showing fibrin thrombi in sinusoid (arrow). PTAH stain. (272×)

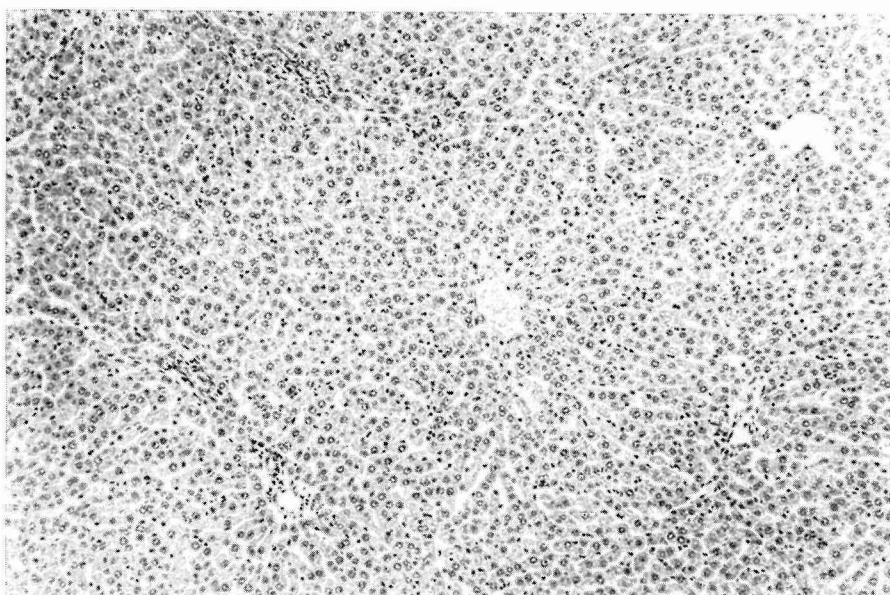


Fig. 7 Light micrograph of rat liver in the pre-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin. Note less changes in the preheparinized group compared to the non-heparinized group. HE stain. (109×)

集，クロマチン間域の減少が著明であった。細胞質は糖原顆粒の著しい減少が見られ，ミトコンドリアは腫脹し，マトリックスの凝集および稀薄化，クリスタの乱れと数の減

少が著明で一部にミトコンドリア膜の断裂も認められた。粗面小胞体（以下 RER と略す）はその数の減少とともに層状構造の乱れや膨化が著しかった (Fig. 8)。光顕所見で

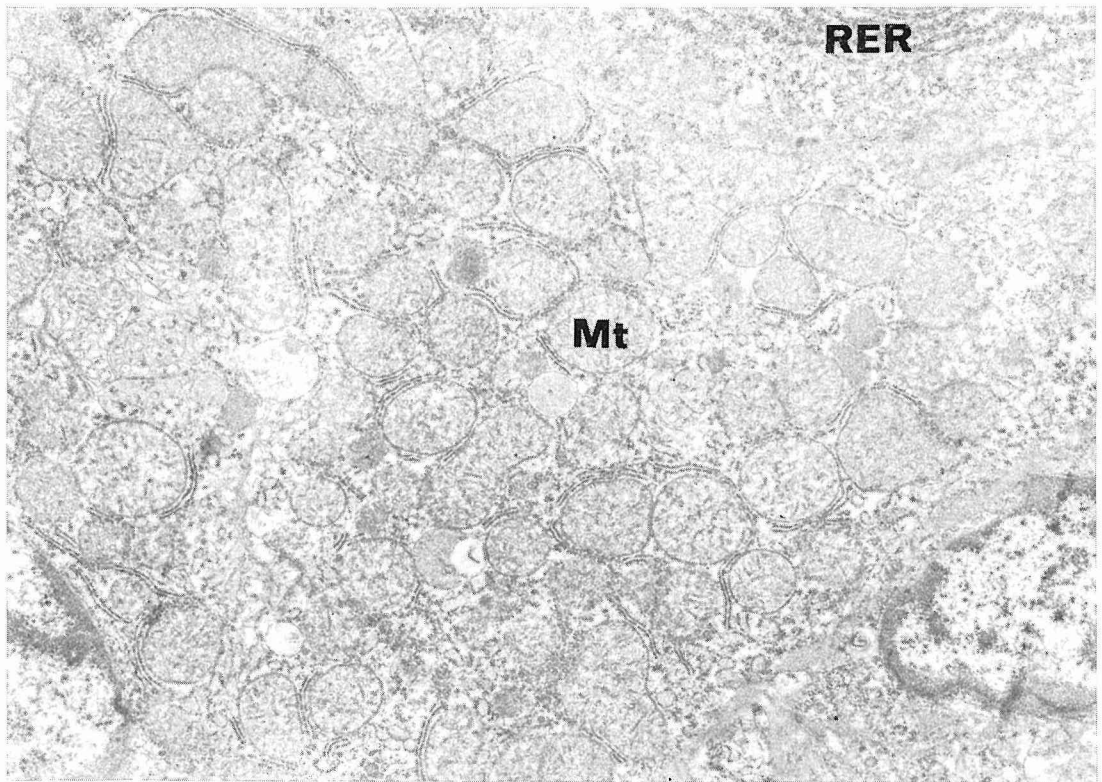


Fig. 8 Electron micrograph of rat hepatocytes in the non-heparinized group 3 hours after endotoxin injection. Many mitochondria (Mt) are swollen and their cristae are irregular. RER is reduced in number and disturbed in lamellar array. (12,000×)

認められた round glassy substances は電顕的には限界膜に囲まれた大型の空胞としてみとめられた。内容はほとんど無構造であるが同心円状構造物を含むものも見られた (Fig. 9)。またこれらの変化は特に類洞に微小血栓が多発している小葉周辺帯の肝細胞において著明であった。類洞は Kupffer 星細胞、血小板、赤血球およびフィブリン様物質などによる微小血栓により閉塞されている像が小葉周辺部に多数見られた。特にフィブリン様物質は多彩な density を有するものが混在しており、周期性は不鮮明であった。このような部位の Kupffer 星細胞の多くは膨潤し、多量のフィブリン様物質貪食像と細胞内小器官の崩壊像とが見られた (Fig. 10)。一方、heparin 前処置群では非処置群 3 時間例に見られたような核質や細胞質の著明な変化は見られず、ミトコンドリア、RER など細胞内小器官の形態は比較的正常に保たれていた。類洞にはほとんどフィブリン様物質や血栓は認められず、Kupffer 星細胞の形態は良く維持されており、貪食変性像はほとんど認められなかった (Fig. 11)。

3・2・3 肝ミトコンドリア機能

Heparin 非処置群では第 1 編⁹⁾で報告したように RCR は 3 時間目に 2.98 ± 0.30 と著明な低下を認めるが、heparin 前処置群は 3.97 ± 0.06 とほとんど低下を認めなかった (Fig. 12)。ADP/O 比は Et 投与 2 時間迄は両群に差を認めず、3 時間目では非処置群 1.39 ± 0.10 、heparin 前処置群 1.60 ± 0.03 と差が認められた (Fig. 13)。ミトコンドリア mg 蛋白当りの 1 分間の ATP 産生能は両群とも Et 投与 2 時間迄は一過性の亢進を認めるが非処置群 3 時間目では 112.14 ± 25.37 n moles ATP/mg protein/min. と急激に低下した。Heparin 前処置群は 3 時間目でも 158.08 ± 10.08 n moles ATP/mg protein/min. と比較的正常に保たれていた (Fig. 14)。

4 考 察

ショック時には生体の諸臓器のミトコンドリア機能は低下し、ATP 合成能は著しく障害される^{23~26)}。しかしながら、エンドトキシンショックの場合このようなミトコンド

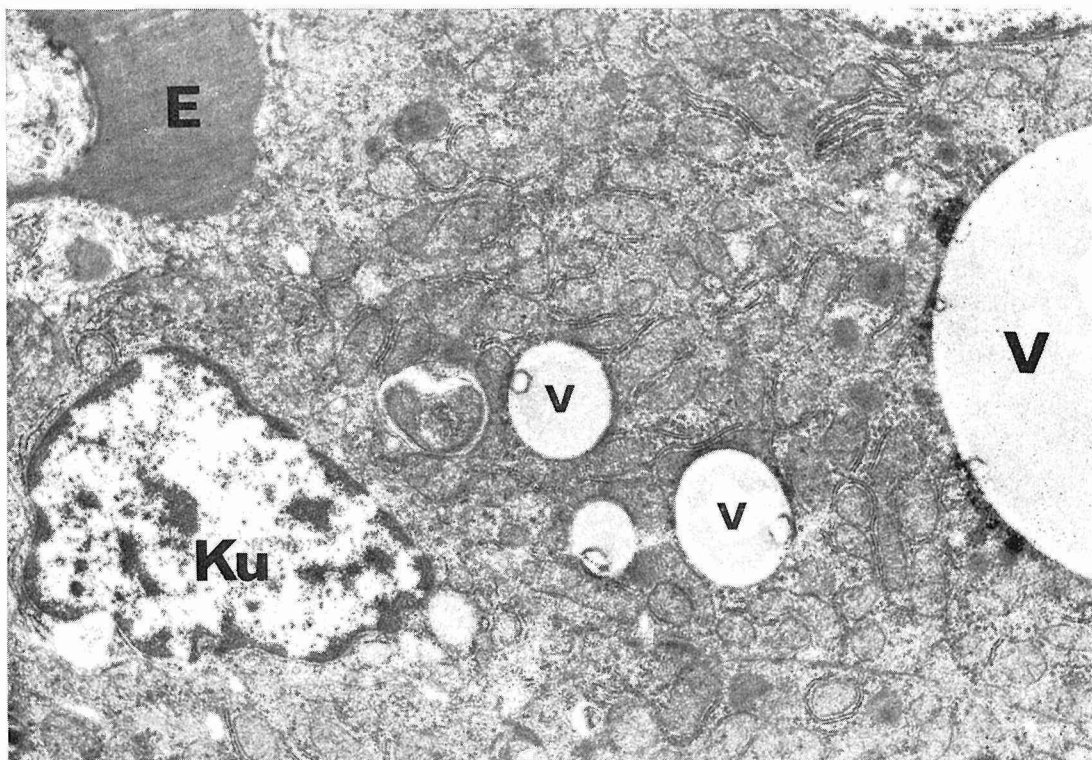


Fig. 9 Electron micrograph of rat hepatocytes in the non-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin, showing many vacuoles (V) in hepatocytes. Kupffer cell (Ku) Erythrocyte (E). (9,700×)

リア機能障害が投与された Et の直接作用なのか、あるいは循環不全にもとづく二次的な変化なのかはまだ明らかではない。原因として下記の3つの仮説が考えられる。まず、Et 自体が直接（あるいは流血中で何んらかの変化を受けた後）細胞内に入り、ミトコンドリアに作用するか、あるいは Et がライソゾームを破壊し²⁷⁾、放出されたライソゾーム酵素がミトコンドリアに作用するとする Et の直接作用説。つぎに、Et がカテコールアミンを遊離させ、微小循環系を構成する細動・静脈に強い収縮を発生させ、細胞の ischemic anoxia を発生させることが主因であるとする末梢循環障害説²⁸⁾。さらに、Et 投与により、全身の細血管に微小血栓が形成され⁴⁰⁾、このため微小循環が障害され、細胞の anoxia が発生することに原因を求める DIC 説である。

著者らは第1編⁸⁾で Et 投与後に肝ミトコンドリア機能障害が発生することを報告し、その原因は Et の直接作用というよりはむしろ組織 anoxia の可能性が強いことを述べた。

さて、DIC であるが、血液は本来凝固しやすい性質をもっているものであり、これに対する防禦機構との間に微妙なバランスが保たれており、このようなバランスが崩れ

た時に DIC 症候群が生ずるという²⁹⁾。この DIC 症候群の発現機序としては外因性または内因性凝固系の活性化、血管壁の障害、血流の異常または網内系の機能低下が考えられている。

一方、Et には血小板損傷作用³⁰⁾、血管内皮損傷作用³¹⁾、白血球損傷作用³²⁾ などがあり、内・外因性の血液凝固機序を作働させるといわれている。これらを考え合せると Et 注入により DIC 症候群が発生する機序は十分うなづける。実験的および臨床的細菌性ショックやエンドトキシンショックにおいて DIC 症候群と考えられる血液凝固線溶異常が発生することは先に述べたが、同時に発生する重要臓器障害や不可逆性ショックへの移行に DIC がいかなる機序で関与しているかについては、いまだ一定の見解が得られていない。そこで本研究ではエンドトキシンショック時に発生する肝細胞障害、特に肝ミトコンドリア機能障害に及ぼす DIC の役割について検討した。

実験結果にもとづいて検討すると、まず Et 投与後5分で急速な血小板減少を示し、その後一時回復するが再び減少傾向を示した。これは生体内に注入された Et が流血中でおそらく免疫学的機構により血小板に吸着され³³⁾、血小

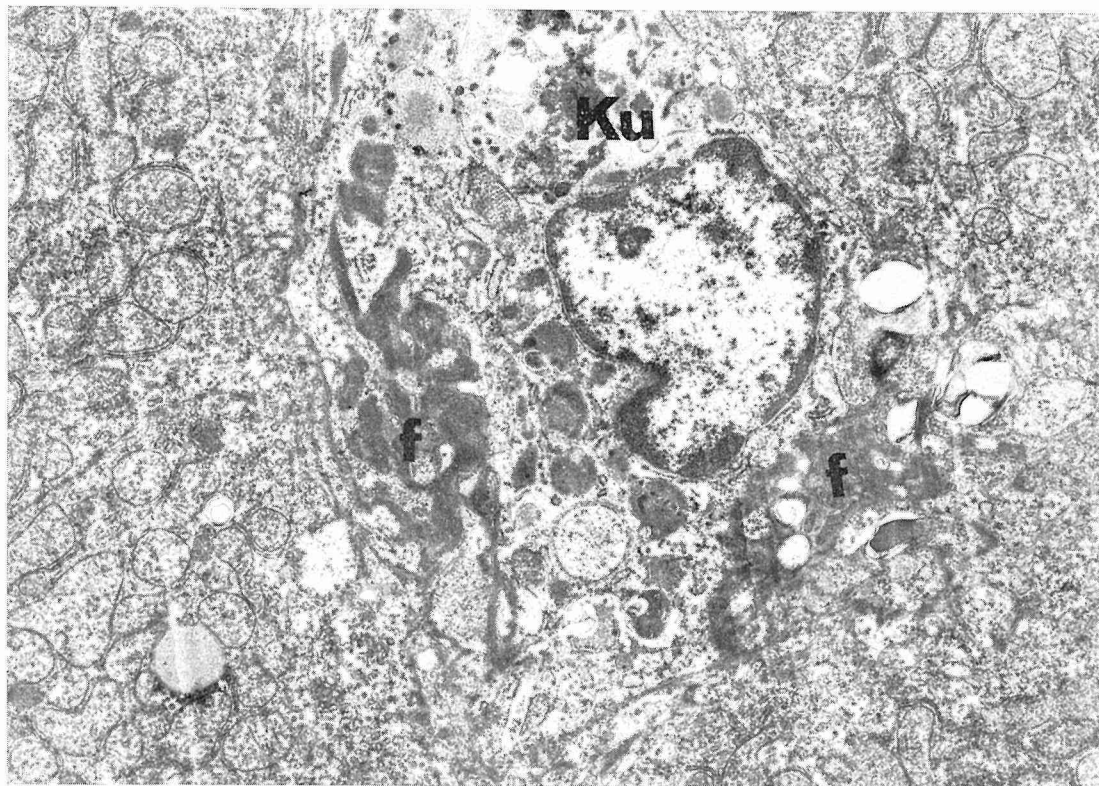


Fig. 10 Electron micrograph of rat liver in the non-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin. Sinusoid are filled with distorted Kupffer cell (Ku) and fibrin (f). (7,900×)

板の凝集がおこり、さらに viscus metamorphosis へと進み、循環血液中より消失すると同時に血小板第3因子、第4因子、セロトニン、ADP および ATP などが放出され、血小板凝集が一層進行し、ますます血小板数が減少したものと考えられる。なお、一時的に血小板数が増加するのは脾臓や骨髓中の血小板が流血中に送り込まれるためと考えられる。

フィブリノーゲンは343,000の分子量をもち、肝臓特に肝のミクロゾームで産生されるとされており³⁴⁾、流血中に放出された後一部は速やかに血管外腔へと移行して平衡状態に達する。血漿フィブリノーゲンの半減期は3~4日と考えられており、その役割は、正常では必要な時、必要な場所で素早く必要な量だけフィブリンへと転化し、有効な止血血栓を形成し、余剰の出血を阻止することである。本実験において、Et投与後3時間目に急激なフィブリノーゲン量の減少があったが、これはEt投与により何らかの凝固機転が発動し、異常な過凝固が発生し、フィブリノーゲンが消費されたと考えられるが、肝実質障害によるフィブリノーゲン産生能の低下が加わっていることも否定で

きない。

FDPはフィブリンあるいはフィブリノーゲンがプラスミンによって分解され産生された物質で、正常では血流中には少量しか存在せず、その増加は近い過去に血栓形成の事実があったことを意味している²⁹⁾。またこのFDPには抗トロンビン作用、血小板凝集阻止作用、フィブリンモノマー重合阻止作用、血管透過亢進作用などがあり²⁹⁾、DICにおける出血症状の主たる原因とされている。本実験ではEt投与2時間目より増加しはじめ、3時間目では著明な増加が見られた。血液学的所見からDICを診断するにはいくつかの診断基準が提案されている^{35,36)}。松田²⁹⁾はDICの診断基準として血小板数、血漿フィブリノーゲン値およびFDP値を重要視している。しかし、このような診断基準はDIC症候群の診断の一つの目安にすぎず、決して絶対的なものではない。本実験例ではEt投与後3時間目には血小板減少、フィブリノーゲン値低下、FDP値の増加という凝血学的に定型的なDIC症候群が明らかとなったが、この以前にすでにDICが発生している可能性が強い。

一方、組織学的に細小血管内に新鮮なフィブリン血栓が

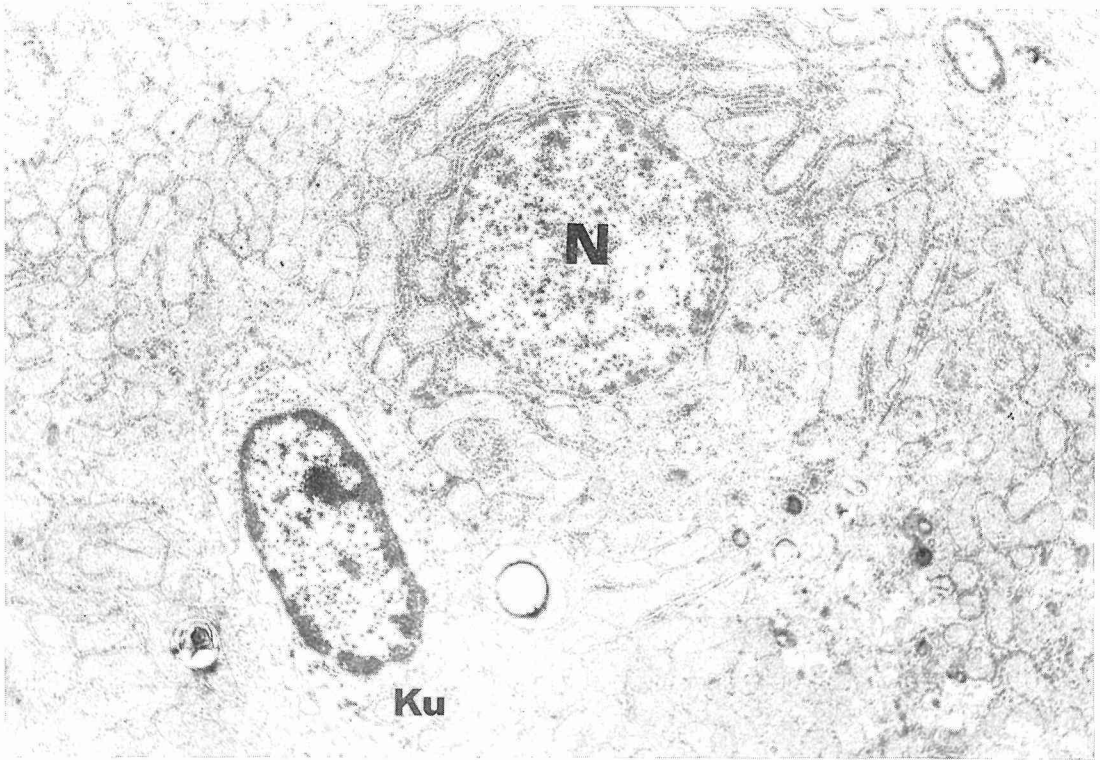


Fig. 11 Electron micrograph of rat hepatocytes in the pre-heparinized group 3 hours after intravenous injection of endotoxin. Hepatocytes appear to be packed with mitochondria due to depletion of glycogen, but hepatocytes and Kupfer cells (Ku) are relatively normal in appearance compared to the non-heparinized group. (5,000×)

多発しておれば、DIC 症候群の診断はほぼ確実となるが、実際、DIC が発生しているにもかかわらず、特に肝臓などでは光顕的にフィブリン血栓が認められないことがあるといわれている。著者らの実験においても光顕的には Et 投与 2 時間例迄フィブリン血栓は認められなかった。この理由として著者らは (1) 血栓は一応形成されるが線溶を受けやすい type の血栓 (成松ら³⁷⁾ のいう均質型フィブリン血栓) が主体をなしているため、(2) fibrin monomer に対する PTAH 染色の不安定性のため、(3) 網内系 (特に Kupffer 星細胞) による活発なフィブリンの処理能などを考えている。本実験では 3 時間例に光顕的に数こそ少ないが、PTAH 染色陽性の明らかなフィブリン血栓が認められた (Fig. 5, 6)。この血栓は電顕的には多彩な density からなるフィブリン様物質として認められ (Fig. 9)、周期性は認められず、成松ら³⁷⁾ のいうフィブリン重合ないし、安定化因子の関与が不十分なフィブリン体と考えられる。このようにフィブリン血栓が 3 時間例に見られたのは (1) 線溶の受けにくい type の血栓 (線維型フィブリン血栓³⁷⁾)

の出現や (2) フィブリン処理能の低下などが考えられる。

つぎに肝の形態的变化について検討してみると本実験の Et 投与 3 時間目に光顕所見で見られた著しい出血や肝細胞の変性壊死は血液学的に DIC が明らかになった時期、あるいはフィブリン血栓が確認された時期に一致しており、さらにフィブリン血栓が多発しているグリソン鞘を中心とする小葉周辺部に強い変化がみられた。このような小葉周辺帯に見られる変化はエンドトキシンショックや子癇に特徴的であるといわれ^{38,39)}、蛍光抗体法による研究では Et が主として周辺帯に認められることから、その関連性を強調するものもあるが⁴⁰⁾、まだ一致した見解はない。そこで著者らは肝臓の血管構築からの検討を加えてみたい。

門脈の Small distributing vein から sinusoid へ移行する部には inlet venules with inlet sphincter が存在するが、Et 投与あるいはエンドトキシンショック時にはこの部に強い収縮が発生すると考えられ、DIC 発生によるフィブリン血栓がこの部で形成され易くなり、その結果門脈のうっ血が発生し、血管の破綻や組織 anoxia がひ

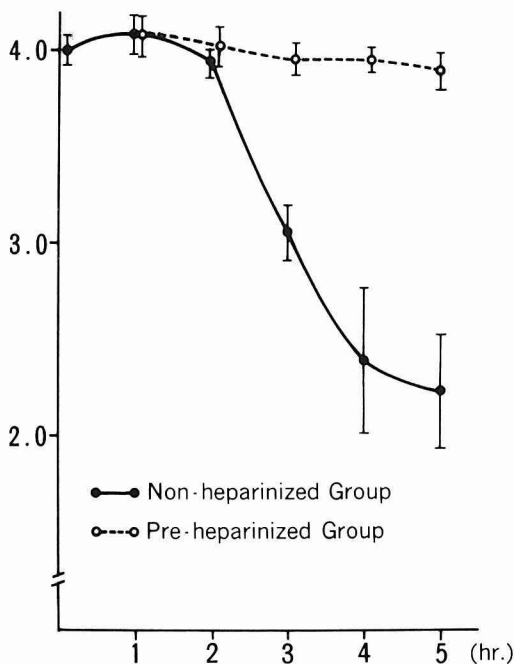


Fig. 12 Respiratory control ratios after injection of endotoxin in rats.

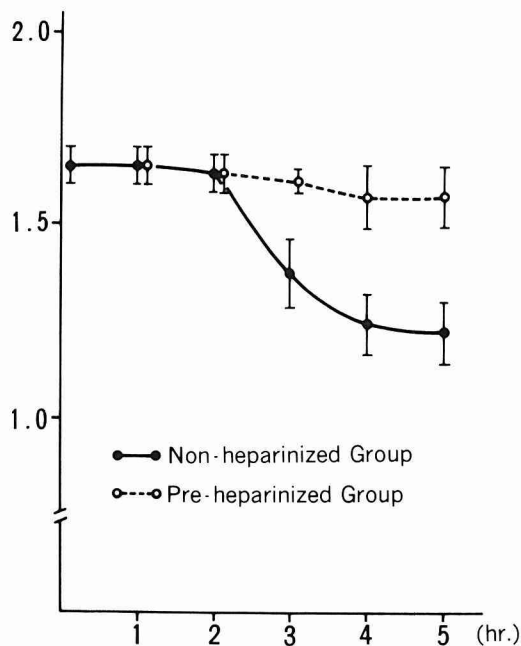


Fig. 13 ADP/O after injection of endotoxin in rats.

きおこされる。一方、小葉中心帯付近では intralobular arterioles から直接血液が供給されているために比較的高い酸素分圧が維持される。従って周辺部組織が特に血栓の

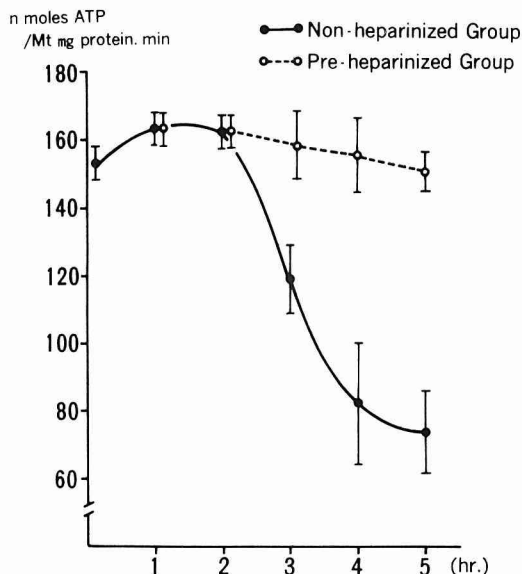


Fig. 14 Phosphorylative activity after injection of endotoxin in rats.

影響を受け易く、hypoxia に陥りやすい。このため出血や肝細胞の変化が強くおこるものと思われる。

Et 投与後の肝の電顕所見については平間・小川²²⁾ が詳細に報告しており、ここでは簡単に述べる。本実験では灌流固定法を用いなかったため類洞内皮細胞の変化については検討できなかったが、平間・小川²²⁾ は血栓が多発するようになってから内皮細胞の変性と類洞壁からの脱落を認めている。Kupffer 星細胞は Et 投与早期から空胞やライソゾームの増加が見られ、次第にフィブリンや血球成分の貪食像が見られるようになり、3 時間目では Kupffer 星細胞は血栓に巻き込まれ、細胞内小器官が崩壊し、変性像が多くみられた (Fig. 10)。この所見はフィブリンの析出が著明となる時期に一致し、先に述べたように網内系のフィブリン処理能の低下を裏付ける所見と思われる。肝細胞に関しては、光顕的に PAS および PTAH 染色陽性の round glassy substances は電顕的には限界膜に囲まれた空胞として認められることは先に述べたが、これは細胞質が変化したもの、あるいは血漿成分の細胞質内への侵入が考えられる。Levy *et al.*⁴¹⁾ はこの所見を Et による特徴的所見であると述べており、一方、平間・小川²²⁾ はこの空胞は微小血栓の形成による類洞の血流障害と類洞壁の破壊により二次的に発生したものとしている。細胞内小器官の変化特にミトコンドリアの腫脹および変形、クリスタの乱れと数の減少や RER の乱れと数の減少などは微小血栓の多発している肝小葉周辺帯から中間帯にかけて著明であり、光顕所見で述べたと同様に anoxia による可能性を強

く示唆している。

つぎに肝のミトコンドリア機能であるが、詳細は第1編⁸⁾に報告したように succinate 基質における RCR, ADP/O 比およびミトコンドリア mg 蛋白当りの ATP 生成能は Et 投与 2 時間目迄は低下を認めなかったが、微小血栓が形成され、肝細胞の変化が著しくなる 3 時間目を過ぎると急激に低下し、電顕所見に認められたミトコンドリアの形態的变化と一致した。このミトコンドリア機能障害は肝細胞の不可逆性の変化を意味しているものと考えている。

以上のように肝の形態的变化および肝ミトコンドリア機能障害の原因として DIC が主要な役割りを演じている可能性が充分考えられる。そこで著者らは抗トロンビン作用をもつ heparin の使用を試みた。

エンドトキシンショック時の heparin の効果についての報告は種々であり、エンドトキシンショックやグラム陰性菌による細菌性ショック実験において heparin が死亡率を改善させるという報告⁴²⁻⁴⁵⁾があるが、いまだ一致した結果が得られていない。それは実験動物の差、Et および heparin の投与量、heparin の投与時期の問題が主な原因であろう。また heparin の作用機序についても現在なお明確でなく、Filkins and DiLuzio⁴⁶⁾は heparin が血中の Et clearance を促進させると報告しており、Gans⁴⁷⁾および Margaretten *et al.*⁴³⁾は凝固過程を heparin が阻止することにより防禦効果を発揮すると述べている。一方、heparin は循環系内において Et を変化させる酵素を活性化させるという報告⁴⁸⁾もあるが定説はまだない。本実験成績では heparin 前処置群は非処置群に比べ、血小板の減少、フィブリノーゲン濃度の低下は少なく、血液学的に DIC の発生をある程度阻止できた。なお、heparin 前処置群において Et 投与早期よりフィブリノーゲン濃度の低下が見られたのは DIC によって生じたのではなく、heparin の影響によるものと考えられる。また 3 時間目にフィブリノーゲン濃度の増加がみられたのは逆に 3 時間を過ぎると heparin の効果がなくなることを示唆している。

組織学的所見では、heparin 前処置群においては非処置群 3 時間目に見られたようなフィブリン血栓は光顕的にも電顕的にもほとんど認められなかった。また光顕的に非処置群 3 時間目にみられたような肝小葉周辺帯の出血や肝細胞の変性壊死も認められず、電顕的にも肝細胞、Kupffer 星細胞の変化は少なく、ミトコンドリア、RER など細胞内小器官の形態も比較的正常に保たれており、heparin 効果が著明であったことを示している。一方、光顕的には PAS, PTAH 染色陽性の round glassy substances は heparin 前処置群の 3 時間例でもその数こそ少ないが明らかに認められた。またこの物質は非処置群においては DIC

の発生あるいはフィブリン血栓形成がまだ見られない 1 時間例にも認められることから、その発生原因が単なる anoxia だけでは充分説明できず、Et 自体が直接細胞質に作用して発生した可能性も否定できない。

つぎに肝ミトコンドリア機能については、血液学のおよび形態学的所見における heparin の効果と同様に heparin 前処置群では 3 時間目を過ぎても RCR, ADP/O 比、ミトコンドリア mg 蛋白当りの ATP 生成能の低下は全く認められなかった。一方、著者らは第1編⁸⁾において、*in vitro* および *in vivo* 実験における ATPase 活性の差、ミトコンドリア機能障害発生時期の差などから、エンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能障害発生原因として anoxia の可能性を強調した。また、門脈血流遮断による hypoxia の実験⁴⁹⁾によっても肝ミトコンドリア機能障害が発生することさらに、非処置群においてすでに障害を受けたミトコンドリアに heparin を添加しても機能の改善が認められなかったことなどを考え併せると肝ミトコンドリア機能障害発生は血栓形成にもつづく組織 hypoxia が重要な役割りを果している可能性が大きい。

つぎに、24 時間生存率をみると heparin 非処置群のラットはすべて 6 時間以内に死亡したのに対し、Table 1 のごとく heparin 処置群特に 1,000 U 前投与した群に生存率の著しい改善が認められたことから、heparin を one shot にて用いる場合には、より早期にかつ大量に投与することが望ましい。しかし、heparin の使用によっても 100% の生存率が得られなかったことから、DIC のみでは説明のつかない点もあり、今後 heparin の投与方法と併せてなお検討する必要がある。

本実験からは heparin の作用機序については明確にできなかったが、エンドトキシンショックに対する heparin の効果は明らかに認められ、少なくとも heparin は血液学的に Et による DIC 症候群の発生を阻止し、微小血栓形成を防止することにより門脈→類洞→中心静脈の肝循環を保持し、肝組織の hypoxia 発生を阻止するものと思われる、かつ死亡率を減少させることが判明した。

以上より、エンドトキシン投与時に発生する肝ミトコンドリア機能障害は DIC 症候群にもつづく微小血栓形成による肝循環不全の結果発生する hypoxia が主要な役割りを果している可能性が示唆された。

5 結 語

エンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能障害発生における DIC の意義を検索する目的でラットを用い、Et 単独投与群と heparin 投与群について、生存率、血液凝固線溶能、肝の病理形態学的変化および肝ミトコンド

ア呼吸能について比較検討し、次の結論を得た。

1) Et (5 mg/100 g) 投与後 24 時間生存率は非処置群では 6 時間以内にすべて死亡したのに対し、heparin 500 U 前投与群 20%, 1,000 U 前投与群 60%, Et 投与後 1 時間目に heparin 1,000 U 投与した群 40%, 2 時間目に投与した群は 20% と heparin 1,000 U 前投与群が最も良かった。

2) 血小板数は非処置群、処置群とも Et 注入後早期に急激に減少するが、まもなく回復し、その後非処置群は再び著しく減少するのに対し、処置群の減少は軽度であった。血漿フィブリノーゲン濃度は非処置群 3 時間目に著しい低下を認めるが、処置群では低下しなかった。血清 FDP 値は非処置群では 2 時間目より増加しはじめた。

3) 非処置群 3 時間目に光顕的、電顕的に小葉周辺帯に著しい出血およびフィブリン血栓が見られるようになり、その周囲の肝細胞、Kupffer 星細胞の変性、壊死が著しく、細胞内小器官の変性も著明であった。一方、前処置群ではフィブリン血栓はほとんど認められず、肝細胞および Kupffer 星細胞の変化は少なく、細胞内小器官も比較的正常に保たれた。

4) 肝ミトコンドリア機能は非処置群 3 時間目になると形態的变化と一致して RCR, ADP/O 比およびミトコンドリア mg 蛋白当りの ATP 生成能が低下したが、前処置群の 3 時間目では正常に保たれた。

以上の結果より、エンドトキシン投与時に発生する肝ミトコンドリア機能障害に DIC の発生が重要な役割を演じている可能性が示唆され、heparin がきわめてすぐれた阻止効果を示すことが判明した。

稿を終えるにあたり、御校閲を賜りました本学病理学第二講座、小野江為則教授に深謝を表します。また御協力をいただきました教室の山島功司先生、横川金弥先生と本学中検病理、成松英明助教授に感謝します。

なお本論文の要旨は第 16 回術後代謝研究会および第 16 回日本消化器外科学会総会で発表した。

文 献

1. Altemeier, W. A., Hummel, R. P., Hill, E. O. and Lewis, S.: Changing patterns in surgical infections. *Ann. Surg.* **178**, 436-445 (1973).
2. Rigby, R. A. and Christy, J. H.: Recovery following prolonged gram-negative shock and "Shock lung". *Am. J. Med.* **45**, 959-966 (1968).
3. Hinshaw, L. B., Solomon, L. A., Holmes, D. D. and Greenfield, L. J.: Comparison of canine responses to *Escherichia coli* organism and endotoxin. *Surg. Gynec. Obst.* **127**, 981-988 (1968).
4. Fogelman, M. J. and Garvey, J. M.: Acute gastroduodenal ulceration incident to surgery and disease. Analysis and review of eighty-eight cases. *Am. J. Surg.* **112**, 651-656 (1966).
5. Braude, A. J., Carey, F. J. and Zalesky, M.: Studies with radioactive endotoxin. II. Correlation of physiologic effects with distribution of radioactivity in rabbits injected with lethal doses of *E. coli* endotoxin labelled with radioactive sodium chromate. *J. Clin. Invest.* **34**, 858-866 (1955).
6. Mayne, Y. C. and Jones, R. S.: Tissue distribution of C^{14} -labeled bacterial polysaccharide in guinea pig, rat, mouse and rabbit. *Proc. Soc. Exp. Med.* **98**, 734-737 (1958).
7. 小野江為則: 肝臓の超微構造病理学. *日病会誌* **57**, 3-36 (1968).
8. 鍋田光一, 小西裕蔵: エンドトキシンのラット肝ミトコンドリアに及ぼす影響についての研究. I 分離肝ミトコンドリアに及ぼすエンドトキシンの影響およびエンドトキシンショック時の肝ミトコンドリア機能について. *札幌医誌* **49**, 511-527 (1980).
9. Schoendorf, T. H., Rosenberg, M. and Beller, F. K.: Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in nonpregnant rats. *Am. J. Path.* **65**, 51-58 (1971).
10. Hardaway, R. M.: Disseminated intravascular coagulation in experimental and clinical shock. *Am. J. Cardiol.* **20**, 161-173 (1967).
11. Hardaway, R. M., Husni, E. A., Geever, E. F., Noyes, H. E. and Burns, J. W.: Endotoxin shock. A manifestation of intravascular coagulation. *Ann. Surg.* **154**, 791-802 (1961).
12. Horwitz, D. L., Moquin, R. B. and Herman, C. M.: Coagulation changes of septic shock in the sub-human primate and their relationship to hemodynamic changes. *Ann. Surg.* **175**, 417-423 (1972).
13. Mc-Kay, D. G., Jewett, J. F. and Reid, D. E.: Endotoxin shock and the generalized shwartzman reaction in pregnancy. *Am. J. Obst. Gynec.* **78**, 546-566 (1959).
14. Mc-Kay, D. G. and Müller-Berghaus, G.: Therapeutic implications of disseminated intravascular coagulation. *Am. J. Cardiol.* **20**, 392-410 (1967).
15. Goldenfarb, P. B., Zucker, S., Corrigan, J. J. and Cathey, M. H.: The coagulation mechanism in acute bacterial infection. *Brit. J. Haemat.* **18**, 643-652 (1970).

16. Corrigan, J. J. and Jordan, C. M.: Heparin therapy in septicemia with disseminated intravascular coagulation. Effect on mortality and correction of hemostatic defects. *New Eng. J. Med.* **283**, 778-782 (1970).
17. Preston, F. E., Malia, R. G., Sworn, M. J. and Blackburn, E. K.: Intravascular coagulation and *E. coli* septicemia. *J. Clin. Path.* **26**, 120-125 (1973).
18. 金井 泉, 金井正光共編: 臨床検査法提要 VI. 63-66, 金原出版, 東京・京都 (1970).
19. 小田琢三: 肝・心筋ミトコンドリアの調整別冊. 蛋白質核酸酵素 (上) **5**, 246-251 (1974).
20. 萩原丈二: ミトコンドリア実験法 2. 酸素電極法による呼吸の測定. 蛋白質核酸酵素 **10**, 1689-1702 (1965).
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L.: Protein measurement with the folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
22. 平岡敏憲, 小川勝洋: エンドトキシン投与時におけるラット肝病変の電子顕微鏡的研究. 札幌医誌 **46**, 425-447 (1977).
23. Mela, L., Bacalzo, L. V., White IV, R. R. and Miller, L. D.: Shock induced alterations of mitochondrial energy-linked functions. *Surg. Forum* **21**, 6-8 (1970).
24. Depalma, R. G., Harano, Y., Robinson, A. V. and Holden, W. D.: Structure and function of hepatic mitochondria in hemorrhage and endotoxemia. *Surg. Forum* **21**, 3-6 (1970).
25. White, R. R., Mela, L., Bacalzo, L. V., Olofsson, K. and Miller, L. D.: Hepatic ultrastructure in endotoxemia, hemorrhage and hypoxia.: Emphasis on mitochondrial changes. *Surgery* **73**, 525-534 (1973).
26. Blackwood, J. M., Hsieh, J., Fewel, J. and Rush, B. F.: Tissue metabolites in endotoxin and hemorrhagic shock. *Arch. Surg.* **107**, 181-185 (1973).
27. Harken, A. H., Lillo, R. S. and Hufnagel, H. V.: Direct influence of endotoxin on cellular respiration. *Surg. Gyne. Obst.* **140**, 858-860 (1975).
28. Lillehei, R. C., Longerbeam, J. K. and Blook, J. H.: Physiology and therapy of bacteremic shock. Experimental and clinical observations. *Am. J. Cardiol.* **12**, 599-613 (1963).
29. 松田 保: DIC 症候群. 中外医学社, 東京 (1977).
30. Horowitz, H. I., Des Frez, R. M. and Hook, E. D.: Effects of bacterial endotoxin on rabbit platelets. II. Enhancement of platelet factor 3 activity *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* **116**, 619-633 (1962).
31. Mc Grath, J. M. and Stewart, G. J.: The effects of endotoxin on vascular endothelium. *J. Exp. Med.* **129**, 833-848 (1969).
32. Niemetz, J.: Coagulant activity of leukocytes. Tissue factor activity. *J. Clin. Invest.* **51**, 307-313 (1972).
33. Spielvogel, A. R.: An ultrastructural study of the mechanisms of platelet-endotoxin interaction. *J. Exp. Med.* **126**, 236-250 (1967).
34. Barnhart, M. I. and Anderson, G. F.: Intracellular localization of fibrinogen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 734-737 (1962).
35. Minna, J. D., Robboy, S. J. and Colman, R. W.: Disseminated intravascular coagulation in man. C. C. Thomas, Springfield (1974).
36. Mant, M. J., Hirsh, J., Pineo, G. F. and Luke, K. H.: Prolonged prothrombin time and partial thromboplastin time in disseminated intravascular coagulation not due to deficiency of factors V and VIII. *Brit. J. Haemat.* **24**, 725-734 (1973).
37. 成松英明, 黒川一郎, 山崎功司: 人 DIC 症例および兎実験的 DIC 例における Fibrin 血栓の性状. 血液と脈管 **10**, 102-105 (1979).
38. Mc-Kay, D. G., Merrill, S. J., Weiner, A. E., Hertig, A. T. and Reid, D. E.: The pathologic anatomy of eclampsia, bilateral renal cortical necrosis, pituitary necrosis, and other acute fatal complications of pregnancy, and its possible relationship to the generalized shwartzman phenomenon. *Am. J. Obst. Gyne.* **66**, 507-539 (1953).
39. Margaretten, W.: Local tissue damage in disseminated intravascular clotting. *Am. J. Cardiol.* **20**, 185-190 (1967).
40. Rubenstein, H. S., Fine, J. and Coons, A. H.: Localization of endotoxin in the walls of the peripheral vascular system during lethal endotoxemia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**, 458-467 (1962).
41. Levy, E., Slusser, R. J. and Ruebner, B. H.: Hepatic changes produced by a single dose of endotoxin in the mouse. Electron microscopy. *Am. J. Path.* **52**, 477-502 (1968).
42. Gans, H. and Krivit, W.: Effect of endotoxin shock on the clotting mechanism of dogs. *Am. Surg.* **152**, 69-76 (1960).
43. Margaretten, W., Mc-Kay, D. G. and Phillips, L.

- L.: The effect of heparin on endotoxin shock in the rat. *Am. J. Path.* **51**, 61-68 (1967).
44. Filkins, J. P. and Di Luzio, N. R.: Heparin protection in endotoxin shock. *Am. J. Physiol.* **214**, 1074-1077 (1968).
45. Horwitz, D. L., Ballantine, T. V. N., Coran, A. G. and Herman, C. M.: Heparin treatment of live *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J. Surg. Res.* **13**, 120-125 (1972).
46. Filkins, J. P. and Di Luzio, N. R.: Effect of heparin and sulfated polysaccharides on *in vitro* hepatic phagocytosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**, 548-551 (1966).
47. Gans, H.: Mechanism of heparin protection in endotoxin shock. *Surgery* **77**, 602-606 (1975).
48. Schultz, D. R. and Becker, E. L.: The alteration of endotoxin by postheparin plasma and its purified fractions. II. Relationship of the endotoxin detoxifying activity of euglobulin from postheparin plasma to lipoprotein lipase. *J. Immunol.* **98**, 482-489 (1966).
49. 山光 進, 鍋田光一, 小西裕蔵, 早坂 滉: コエンザイム Q と肝ミトコンドリア機能—エンドトキシンと組織ハイポキシアに対する効果—. 術後代謝研究会誌 **12**, 72-76 (1978).
-
- 別刷請求先: (〒060) 札幌市中央区南 1 条西 16 丁目
札幌医科大学外科学第 1 講座 鍋田 光 一